

in amyloïdo

Inactivation des agents impliqués dans les amyloïdoses par un nouveau nettoyant alcalin répondant au nouveau protocole de contrôle d'efficacité d'amyloïcidie

Guillaume Fichet, Franklab France

RÉSUMÉ

Le risque iatrogène de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) est clairement identifié depuis de très nombreuses années. Une liste de produits inactivants totaux est proposée par l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et produits de santé (ANSM) depuis 2011 pour prévenir ce risque. Mais ce protocole a ses limites avec la plupart des traitements qui ne sont que partiellement efficaces voire inefficaces aussi bien sur la souche recommandée que sur les prions humains. Par ailleurs, celui-ci ne prend pas en compte l'évolution des connaissances sur d'une part les techniques ultrasensibles de détection et d'autre part sur les amyloïdoses où un nouveau risque de transmission secondaires inter-humaine n'est pas exclu. Nous proposons ainsi une évolution du protocole erroné en vigueur vers un nouveau protocole de contrôle d'efficacité d'amyloïcidie. Un produit utilisable en laveur désinfecteur d'instruments (1% 10 minutes 55°C) répond déjà à ce nouveau protocole.

INTRODUCTION

À ce jour, même si le nombre de cas cliniques de la forme variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) reste faible au regard de l'exposition de la population humaine à l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine, l'existence de nombreux cas asymptomatiques est fortement suspectée et l'infectiosité associée avec le sang et d'autres tissus périphériques justifie la recherche de nouvelles formulations et procédés compatibles capables d'éradiquer le risque de transmission secondaire des prions via les dispositifs médicaux et la transfusion sanguine (Gill *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014). Les risques avérés de transmission iatrogène de la maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadiques et l'absence de diagnostic ante-mortem de cette maladie imposent également des contraintes de décontamination des dispositifs médicaux en milieu hospitalier. Les autorités françaises de santé publique sous l'égide de l'ANSM ont établi une liste de produits inactivants totaux vis-à-vis des prions, répondant au Protocole Standard Prions (PSP). Celui-ci est essentiellement basé

sur l'inactivation des prions 263K (souche de tremblante du mouton adaptée au hamster). Cependant, l'utilisation du couple hamster/souche de 263K pour tester des produits inactivant n'est pas adaptée à une problématique de santé humaine. Par ailleurs, l'efficacité des procédures d'inactivation dépend du type de prion (ou souche) et de l'espèce hôte auxquelles elles s'adressent (Giles *et al.*, 2008). Par ailleurs, une étude très récente vient remettre en cause la liste des produits publiés par l'ANSM, qui devraient pourtant revendiquer une inactivation totale vis-à-vis des prions. La plupart sont partiellement efficaces voire inefficaces sur des prions de tremblante et sur des prions humains (Belondrade *et al.*, 2016).

Outre les maladies à prion, d'autres atteintes neurodégénératives humaines sont dues au mauvais repliement des protéines (ou amyloïdoses), notamment la maladie d'Alzheimer (protéine impliquée = peptides A β issus de la protéine APP), la maladie de Parkinson (protéine impliquée = α -synucléine) et la maladie de Huntington (protéine impliquée = polyQ). Ces maladies se caractérisent par des dépôts extra-cellulaires ou intra-cellulaires de protéines sous formes de plaques amyloïdes. La maladie de Creutzfeldt-Jakob était considérée comme étant la seule amyloïdose transmissible jusqu'à ce que des évidences expérimentales suggèrent que les protéines impliquées dans la maladie de Parkinson et d'Alzheimer puissent se transmettre d'individu à individu (Jaunmuktane *et al.*, 2015; Prusiner *et al.*, 2015; Frontzek *et al.*, 2016).

Pour répondre à la problématique des amyloïdoses en santé humaine, nous avons tout d'abord mis à profit dans le cadre des maladies à prions, des modèles de souris transgéniques, exprimant la protéine normale, susceptibles à l'infection par des prions humains (Beringue *et al.*, 2008; Moudjou *et al.*, 2014). Des techniques acellulaires ultrasensibles d'amplification (proteïn misfolding cyclic amplification ou PMCA) optimisées à partir de la littérature (Saborio *et al.*, 2001) sont retenues afin de tester les propriétés prionocides de formulation d'intérêt. Nous avons en parallèle développé et breveté une méthode innovante sur homogénat de cerveau sans aucun support physique pour étudier

l'inactivation dans son ensemble. Les recherches ont été aussi élargies aux autres amyloïdoses pour proposer un nouveau protocole de contrôle d'efficacité d'amyloïcidie (PCEA) qui viendrait remplacer le PSP erroné toujours en vigueur.

RÉSULTATS

Développement d'une technique d'amplification *in vitro* des prions de la souche 263K et résultats en bioessai

A partir de la littérature, nous avons développé et optimisé la technique d'amplification ou PMCA sur homogénat direct (Moudjou *et al.*, MBio) et par adsorption sur tiges métalliques des prions de la souche 263K, souche de référence du PSP en vigueur.

Pour les études *in vitro* puis *in vivo*, nous avons choisi comme témoins la soude (1N, 1 heure, 20°C) et un traitement de la liste ANSM choisi au hasard. Une formulation candidate est testée pour une application à 1 % pendant 10 minutes à 55°C. Alors qu'après traitement par la soude, l'activité de conversion en PMCA des prions 263K est abolie, la solution commerciale n'a montré aucune efficacité. Quant à la formulation candidate, celle-ci a totalement abolie l'activité.

Le bioessai chez le hamster selon le PSP (tige implantée à demeure) a confirmé les résultats avec la formulation candidate qui inactive bien les prions 263K.

Développement d'une technique d'amplification *in vitro* des prions de la souche vMCJ et résultats en bioessai chez la souris transgénique

Nous avons ensuite évalué l'activité sur un homogénat direct et par adsorption sur tiges métalliques de prions humains vMCJ. Comme précédemment, nous avons choisi comme témoins la soude (1N, 1 heure, 20°C) et le même traitement de la liste ANSM choisi au hasard.

Alors qu'après traitement par la soude, l'activité de conversion en PMCA des prions vMCJ est abolie, la solution commerciale n'a montré aucune efficacité. Quant à la formulation candidate, celle-ci a totalement abolie l'activité de conversion.

Modèles de souris transgénique

Les modèles de souris transgéniques sont déjà disponibles exprimant les souches humaines MM1 et vMCJ (Beringue et al, PLoS One 2008, Douet et al, EID 2014). L'inactivation d'un produit ou d'une formulation est évaluée par inoculation de l'homogénat en direct pour confirmer les résultats obtenus en PMCA. Les bioessais ont confirmé que la nouvelle formulation inactive bien les prions humains (bioessai toujours en cours avec la souche vMCJ). Au vu des résultats surprenants obtenus avec la formulation commerciale listée, nous avons intégré un groupe traité avec celle-ci dans un bioessai (souche MM1) en plus du contrôle soude. Alors que la soude est bien inactivante, la formulation commercialisée ne réduit que partiellement l'infectiosité des prions humains, autrement dit les animaux ont développé des signes cliniques et sont tous morts de la maladie.

Evolution du PSP vers le PCEA

En plus de l'étude publiée en 2016 (Belondrade et al., 2016), nous confirmons qu'au moins un traitement de la liste n'inactive pas les prions.

Contrairement aux agents prions dont l'inactivation est régie par ce protocole standardisé établi par l'ANSM (voir ci-dessus) qui a démontré ses limites, il n'existe pas de protocole recommandé pour étudier les agents impliqués dans les amyloïdoses. Nous en avons élaboré un pour évoluer depuis le PSP vers le nouveau PCEA.

Pour les amyloïdoses autre que les prions, nous avons utilisé comme modèle d'étude l'alpha synucléine humaine. Seules des études *in vitro* en direct et sur adsorption de surfaces en utilisant la technique ultrasensible de PMCA sont retenues. La nouvelle formulation candidate a totalement aboli l'activité PMCA de l'alpha synucléine humaine. Elle est donc capable de totalement désassembler les structures fibrillaires.

Les principaux critères d'évaluation de ce nouveau protocole sont :

- Pour les amyloïdoses prions, nous proposons d'utiliser des souches humaines (sporadiques et variantes) et de traiter l'inoculum dans son ensemble et aussi en conservant la tige par des tests de criblage *in vitro* utilisant une méthode de détection sensible comme la PMCA avant de vérifier l'infectiosité résiduelle uniquement par injection directe par voie intracérébrale à l'animal receveur.
- Pour les autres amyloïdoses, le modèle utilisé est l'alpha synucléine dont les résultats pourront être étendus aux autres amyloïdoses humaines. Seules des études *in vitro* en direct et sur adsorption de surfaces en utilisant la PMCA sont proposées et pourront évoluer en fonction des connaissances.

CONCLUSION

- Les techniques d'amplification acellulaires des prions permettent de cribler en routine des formulations d'intérêt revendiquant une inactivation totale vis-à-vis des prions humains dans un contexte de santé humaine.
- Les modèles de souris transgéniques permettent de valider en terme de réduction d'infectiosité ces formulations.
- Il est incomplet de seulement adsorber les prions sur un support physique pour étudier leur inactivation par bioessai. Le décrochage est seulement étudié *in vitro*. L'utilisation de l'inoculum en direct présente l'avantage de mesurer le titre infectieux apparent et sa réduction par les formulations d'intérêt sur une quantité précise de matériel infectieux.
- Confirmation en plus d'une autre étude publiée qu'au moins un traitement commercialisé listé par l'ANSM se révèle inefficace vis-à-vis de ce type d'agent et que par conséquent le PSP ne peut plus être le protocole de référence.
- Nous proposons une évolution du PSP erroné vers un protocole prenant en compte les amyloïdoses. Il s'agit du protocole de contrôle d'efficacité d'amyloïcidie (PCEA).
- A ce jour, un produit fabriqué par un laboratoire français répond déjà au nouveau PCEA proposé et constitue une avancée technique pour la pré-désinfection mécanisée.

A la lumière de ces résultats, le protocole PSP en vigueur actuellement devrait évoluer pour incorporer la technique PMCA, des modèles de titrage de prions humains et des autres agents impliqués déjà décrits. Le PCEA proposé ici est déjà une évolution du PSP. Les produits actuellement utilisés ne répondent pas à ce PCEA.

REMERCIEMENTS

Travaux réalisés en partie dans les laboratoires de l'UR892 Virologie Immunologie Moléculaires, à l'INRA de Jouy-en-Josas, France.

RÉFÉRENCES

- <http://ansm.sante.fr/Dossiers/Creutzfeldt-Jakob-et-produits-de-sante/Protocole-Standard-Prion-lutte-contre-les-infections-liees-aux-soins/offset/0>
- <http://www.google.com/patents/EP2732827A1?cl=fr>
- Belondrade M, Nicot S, Beringue V, Coste J, Lehmann S, Bougard D. (2016). Rapid and Highly Sensitive Detection of Variant Creutzfeldt - Jakob Disease Abnormal Prion Protein on Steel Surfaces by Protein Misfolding Cyclic Amplifi-

cation: Application to Prion Decontamination Studies. *PLoS One*. ;11(1):e0146833.

- Beringue, V., Le Dur, A., Tixador, P., Reine, F., Lepourry, L., Perret-Liaudet, A., Haik, S., Vilotte, J. L., Fontes, M. and Laude, H. (2008). Prominent and persistent extraneural infection in human PrP transgenic mice infected with variant CJD. *PLoS One*, **3**, e1419.
- Chen CC, Wang YH. (2014). Estimation of the exposure of the UK population to the bovine spongiform encephalopathy agent through dietary intake during the period 1980 to 1996. *PLoS One*. ;9(4):e94020.
- Frontzek K, Lutz MI, Aguzzi A, Kovacs GG, Budka H. (2016). Amyloid-pathology and cerebral amyloid angiopathy are frequent in iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after dural grafting. *Swiss Med Wkly*;146:w14287.
- Giles K, Glidden DV, Beckwith R, Seoanes R, Peretz D, DeArmond SJ, Prusiner SB. (2008). Resistance of bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions to inactivation. *PLoS Pathog*. ;4(11).
- Gill ON, Spencer Y, Richard-Loendt A, Kelly C, Dabaghian R, Boyes L, Linehan J, Simmons M, Webb P, Bellerby P, Andrews N, Hilton DA, Ironside JW, Beck J, Poulter M, Mead S, Brandner S. (2013). Prevalent abnormal prion protein in human appendixes after bovine spongiform encephalopathy epizootic: large scale survey. *BMJ*;347:f5675.
- Jaunmuktane Z, Adlard P, Bjurström N, Caine D, Lowe J, Norsworthy P, Hummerich H, Druyeh R, Wadsworth JD, Brandner S, Hyare H, Mead S, Collinge J. Iatrogenic CJD due to pituitary-derived growth hormone with genetically determined incubation times of up to 40 years. *Brain*. 2015 Nov;138(Pt 11):3386-99.
- Moudjou, M., Sibille, P., Fichet, G., Reine, F., Chapuis, J., Herzog, L., Jaumain, E., Laferrière, F., Richard, C. A., Laude, H., Andreoletti, O., Rezaei, H. and Beringue, V. (2014). Highly infectious prions generated by a single round of microplate-based protein misfolding cyclic amplification. *MBio*, **5**, e00829-00813.
- Prusiner SB, Woerman AL, Mordes DA, Watts JC, Rampersaud R, Berry DB, Patel S, Oehler A, Lowe JK, Kravitz SN, Geschwind DH, Glidden DV, Halliday GM, Middleton LT, Gentleman SM, Grinberg LT, Giles K. Evidence for α -synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Sep 22;112(38):E5308-17.
- Saborio, G. P., Permanne, B. and Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, **411**, 810-813. |